

10/542161  
PCT/JP03/09165  
Rec'd PCT/PTO 14 JUL 2005  
18.07.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 05 SEP 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 1月28日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-018343  
[ST. 10/C]: [JP2003-018343]

出 願 人  
Applicant(s): 科学技術振興事業団

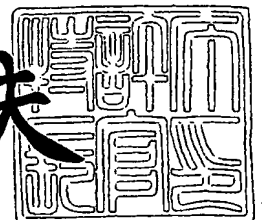
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3068731

【書類名】 特許願

【整理番号】 PS03-1238

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿2丁目111

    【氏名】 宮本 薫

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県坂井郡丸岡町新鳴鹿2丁目100

    【氏名】 水谷 哲也

【発明者】

    【住所又は居所】 福井県吉田郡松岡町神明1-140

    【氏名】 梶谷 宇

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

    【識別番号】 100087631

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 滝田 清暉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100110249

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 下田 昭

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 011017

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 転写活性化因子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）又は（b）から成る転写活性化因子。

（a）配列番号1のアミノ酸配列から成るタンパク質

（b）アミノ酸配列（a）において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、転写活性化能を有するタンパク質

【請求項2】 請求項1に記載の転写活性化因子を有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤。

【請求項3】 請求項1に記載の転写活性化因子を特異的に認識し結合することができる抗体又はアンタゴニスト。

【請求項4】 被検者から生殖系器官の細胞を採取する段階、及び採取した細胞に対する請求項3に記載の抗体又はアンタゴニストの反応性を調べる段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法。

【請求項5】 請求項3に記載の抗体又はアンタゴニストを有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤のスクリーニング剤。

【請求項6】 以下の（a）又は（b）から成る転写活性化因子の遺伝子。

（a）配列番号2の塩基配列から成るDNA

（b）配列番号1のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り転写活性化能を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項7】 被検者から請求項6に記載の遺伝子に相当する部分を含むDNAを採取する段階、及び採取したDNAを請求項6に記載の遺伝子の塩基配列と比較する段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、転写活性化因子に関し、より詳細には、生殖系器官に特異的に発現する転写活性化因子GCX-1に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

卵巣における特定の現象、即ち卵胞形成、排卵、又はステロイド産生のような現象はその組織における遺伝子発現に完全に依存している。卵巣における機能と遺伝子の関係を解明するために多くの研究が行われてきた (Endocr Rev 15: 72 5-751 (1994); Mol Cell Endocrinol 163: 61-66 (2000); Endocrinology 142: 2184-2193 (2001); Trends Endocrinol Metab 13: 169-173 (2002); Biol Reprod 67: 900-910 (2002))。

発明者らは、卵胞発育の分子メカニズムに焦点を当て、ゴナドトロピンにより誘導される多くの卵巣の遺伝子を同定した (Biochem Biophys Res Commun 230: 518-523 (1997); J Biol Chem 275: 22512-22519 (2000); Biol Reprod 64: 1315-1319 (2001); Biol Reprod 66: 1813-1819 (2002); Sekiguchi T et. al., Transcriptional regulation of epiregulin gene in the rat ovary. Endocrinology in press.)。ゴナドトロピン処置によりラットの卵巣中に強く誘導される新規の転写抑制因子を最近報告し、GIOT-1 (gonadotropin-inducible ovarian transcription factor-1) と命名した (非特許文献1)。次いで、発明者らはGIOT-1の生理学的機能を明らかにするために、卵巣においてGIOT-1と相互作用を示す蛋白を同定する試みを行い、転写性の調節補助因子TIF1 $\beta$  (transcriptional intermediary factor 1 $\beta$ , Proc Natl Acad Sci USA 93: 1422-1426 (2001); Mol Cell Biol 18: 5880-5887 (1998); Genes Dev 15: 3023-3038 (2001)) と転写調節因子RIC (rat homologs of human I-mfa domain containing protein, J Biol Chem 275: 4848-4857 (2000)) がGIOT-1と相互作用を示すことを報告した (非特許文献1)。

## 【0003】

生殖組織中に発現することが知られている転写因子としてAd4BP/SF-1とDAX-1がある (非特許文献2～4)。Ad4BP/SF-1は、ステロイド産生酵素、StAR又はGIOT-1などを含むステロイド産生と関連する多くの遺伝子を調節している。また胚形成中の生殖システムの発育において、Ad4BP/SF-1は重要な役割を演じている。DAX-1もAd4BP/SF-1の機能と拮抗することによりその組織の発育に関与している。

しかし、これらの因子は副腎腺中にも発現しており、副腎腺の発育にも関与しているため、生殖系器官特異的ではない。

【0004】

【非特許文献1】

Mol Endocrinol 15: 1693-1705 (2001)

【非特許文献2】

Endocr Rev 18: 361-377 (1997)

【非特許文献3】

Recent Prog Horm Res 51: 241-260 (1996)

【非特許文献4】

Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996)

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、生殖組織中に発現する転写因子であるAd4BP/SF-1やDAX-1（非特許文献2～4）とは異なり、生殖組織に特異的であり、視床下部一下垂体－生殖腺軸中で重要な役割を有していると考えられる新規な転写因子GCX-1を提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

発明者らは、生殖組織における転写因子の研究（非特許文献1）の過程において、ラットの卵巢顆粒膜細胞cDNAライブラリーから、HMG-boxドメインを含有する転写因子様蛋白をコード化する新規のクローンを単離した。発明者らは、この新規遺伝子GCX-1（agranulosa cell HMG-box protein-1、配列番号2）を単離し、GCX-1の構造と分布を決定し、GCX-1の生殖系、特に卵巢における役割を解明するために、その遺伝子の機能を解析した。またGCX-1の発現パターンについて実験し、GCX-1蛋白は生殖と関連する組織、即ち、視床下部、下垂体、生殖腺、子宮においてのみ発現していることを見出し、更にGCX-1蛋白が核内に局在していることを見出した。更に発明者らはGAL4を基本とする非相同性検定法を用いて、GCX-1が遺伝子転写を活性化することを確認した。

【0007】

即ち、本発明は、以下の（a）又は（b）から成る転写活性化因子である。

- （a）配列番号1のアミノ酸配列から成るタンパク質
- （b）アミノ酸配列（a）において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、転写活性化能を有するタンパク質

この転写活性化能は視床下部、下垂体、生殖腺、子宮などの生殖に関連する組織における転写活性化能をいい、レポーター遺伝子を用いた公知の方法により知ることができる。

また、遺伝子治療の目的で、この因子を生殖系細胞に導入し、細胞内での転写を活性化することができる。従って、本発明は、この転写活性化因子を有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤である。

#### 【0008】

更に、本発明は、この転写活性化因子を特異的に認識し結合することができる抗体又はアンタゴニストである。

この抗体は、本発明の転写活性化因子又はその活性部分をマウスなどの適当な動物に投与して、免疫反応を起こさせ、脾臓などの抗体産生組織から採取することができる。

また、このアンタゴニストは、例えば、本発明の転写活性化因子又はその活性部分から予想される立体構造から、結合可能な化合物をスクリーニングすること、又は、本発明の転写活性化因子又はその活性部分と結合するペプチドライブラリーを2ハイブリッドシステムを用いてスクリーニングすることにより、取得することができる。

#### 【0009】

また、このアミノ酸配列を認識する抗体を作成し、患者の卵巣顆粒膜細胞（これは体外受精の治療の際に卵とともに採取されてくるので利用可能）での量を調べることにより、GCX-1の産生異常を知ることができる。

即ち、本発明は、被検者から生殖系器官の組織を採取する段階、及び採取した細胞に対する上記抗体又はアンタゴニストの反応性を調べる段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法である。

ここで生殖系器官とは視床下部、下垂体、生殖腺、子宮などをいい、生殖系器

官の異常に起因する疾患とは、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等をいう。

また、本発明は上記抗体又はアンタゴニストを有効成分とする、転写活性化を目的とする薬剤のスクリーニング剤である。

#### 【0010】

更に、本発明は、以下の (a) 又は (b) から成る転写活性化因子 (GCX-1) の遺伝子である。

(a) 配列番号 2 の塩基配列から成る DNA

(b) 配列番号 1 のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は該アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り転写活性化能を有するタンパク質をコードする DNA

この転写活性化能は、例えば、実施例 5 に記載した方法により、この遺伝子と共に適当なレポーター遺伝子を適当な細胞に導入して該レポーター遺伝子の発現を調べることにより知ることができる。

#### 【0011】

また、患者の白血球からゲノム DNA を分離し、GCX-1 の塩基配列に異常があるかどうかを調べることができる。

即ち、本発明は、被検者から上記遺伝子に相当する部分を含む DNA を採取する段階、及び採取した DNA をこの遺伝子の塩基配列と比較する段階から成る、生殖系器官の異常に起因する疾患の検査方法である。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

本発明者らは、卵巣中に卓越して発現している新規遺伝子 GCX-1 をラットの卵巣顆粒細胞の cDNA ライブラリーから単離した (実施例 1)。GCX-1 遺伝子は、既によく研究されている DNA 結合モチーフの一種であり、酵母から哺乳類まで全ての真核生物に広く分布している HMG-box モチーフを含む蛋白をコードしている。

HMG-box は酵母から哺乳類まで真核生物に広く分布している DNA 結合モチーフの一つであり (Trends Genet 10: 94-100 (1994); Trends Biochem Sci 26: 163-174 (2001))、多くの HMG-box 含有蛋白は、各種の生理学的現象、例えば rRNA 転写



調節因子としてのUBF (Science 241: 1192-1197 (1988); Nature 344: 830-836 (1990))、性決定に必須の蛋白としてのSRY (Nature 346: 240-244 (1990); Nature 346: 245-250 (1990))、T細胞分化調節因子としてのTCF (Nature 374: 70-74 (1995))とTOX (Nature Immunol 3: 272-280 (2002))などの重要な役割を演じていることが知られている。更に、ある種のHMG-box含有蛋白が転写調節物質としてではなく、細胞内の信号伝達物質として機能していることが最近報告された (Science 1999 285: 248-251 (1999); J Exp Med 192: 565-570 (2000); Nature 418: 191-195 (2002))。加えて、HMG-box蛋白が核のステロイドホルモン受容体と反応し、転写補助因子として作用することが報告されてきた (Mol Cell Biol 18: 4471-4487 (1998); Steroids 64: 576-586 (1999))。そのために、HMG-box蛋白は生殖-内分泌系の生物学的機能に強く関与していると考えられる。

#### 【0013】

HMG-boxモチーフを有する蛋白は、DNA結合様式により大まかに2群に分けられる。SRY又はTCFのような1群の蛋白はそれらの標的遺伝子上の特定のDNA配列を認識する。HMGB1、UBFなどの他の群に所属する蛋白は、非特異的DNA結合能を示す。前者の蛋白は1個のHMG-boxモチーフのみを有するが、後者の蛋白は2個又はそれ以上のHMG-boxモチーフを有している (Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996); Trends Genet 10: 94-100 (1994))。

GCX-1は特定のタイプのHMG-box蛋白のように1個のHMG-boxモチーフしか持たないが (実施例1)、GCX-1のHMG-box内のアミノ酸配列は、非特異的タイプのHMG-box蛋白 (Trends Genet 10: 94-100 (1994); Trends Biochem Sci 26: 163-174 (2001))の配列と低い有意な類似性を示しており、特異的タイプの蛋白とは明らかに類似性がない。それ故に、GCX-1は新規タイプのHMG-box蛋白に属すると考えられる。

#### 【0014】

GCX-1の遺伝子発現は、卵巣、睾丸、下垂体、視床下部に限定されていることから、GCX-1は視床下部-下垂体-生殖腺軸で作用していると考えられる (実施例2)。同様に転写因子であるAd4BP/SF-1とDAX-1はステロイド産生と内分泌組織の胚発育に必須であり、GCX-1と類似した遺伝子発現パターンを示す (Endocr

Rev 18: 361-377 (1997); Recent Prog Horm Res 51 : 241-260 (1996); Mol Endocrinol 10: 1261-1272 (1996))。しかし、これらの遺伝子は、GCX-1が全く発現していない副腎腺でも発現しており、生殖組織中でのみ発現している転写因子は今までに知られていない。一方、P450アロマターゼ (Endocr Rev 15: 342-355 (1994)) と I 型  $17\beta$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素をコード化する遺伝子 (Mol Cell Endocrinol 171: 71-76 (2001); Endocr Rev 18: 281-305 (1997)) は生殖組織中にのみ発現していることが知られているが、これらは下垂体中では発現していない。それ故に、GCX-1は視床下部-下垂体-生殖腺システムにおいて重要な役割を演じていると考えられる。

#### 【0015】

in situ融合研究によりGCX-1の遺伝子発現はステロイド産生活性が未だ非常に低い、早期段階の卵胞の顆粒細胞に限定していることが明らかになった (実施例 3)。そして、GCX-1の遺伝子発現が他のステロイド産生組織である副腎腺又は胎盤では見られなかったという所見は、GCX-1がステロイドホルモンの生合成において重要な役割をしていないことを示唆している。むしろ、それは生殖組織の胚発育又は早期段階の卵胞の成長と発育においてある役割を演じていると考えられる。早期段階の卵胞における現象はゴナドトロピン刺激に依存していないと思われる。顆粒膜細胞中においてゴナドトロピンによりGCX-1の誘導がないという所見は、上の推測と一致していると考えられる。

#### 【0016】

GCX-1のウェスタンブロッティング解析により、GCX-1遺伝子産物は卵巣の顆粒細胞の核内に実際に存在していることが明らかになり、GFP融合蛋白解析により、推定上のNLSモチーフはGCX-1の核内転座に必須であることが明らかとなった (結果は省略する。)。加えて、GAL4融合蛋白を基本とする非相同性レポーター検定法により、GCX-1は強力な転写活性化因子であることが明らかとなった。これらのデータはGCX-1は生殖組織中で転写活性化因子として作用することを示唆している。GCX-1の活性化ドメインをN末端から25-63個の残基間の部位であることを示した。GCX-1は夫々セリン、プロリン、リジン残基が豊富な部位も有しているが、これらの部位は転写活性には不要であった。活性化ドメインはLXXLL

のような典型的な転写活性化モチーフ (Genes Dev 12: 3357-3368 (1998); Cell 108: 465-474 (2002); Endocrinology 143: 2461-2465 (2002)) を有していないが、その部位は疎水性アミノ酸残基が豊富で且つLXXLL様の配列を有している。LXXLLモチーフは核のステロイドホルモン受容体又は核内の相互活性化因子との相互作用に必要であることが知られている。しかし、発明者らはGCX-1活性化ドメインと数種の既知の相互活性化因子間での相互作用を確認できなかった（データは示さない。）。位置特定変異解析の結果から、発明者らは、完全な活性を示すためにはGCX-1活性化ドメインの全体構造が必要であるに違いないと結論した。GCX-1活性化ドメインの二次又は三次構造に関する情報はほとんどないが、上記の所見はGCX-1活性化ドメインは新規タイプの相互活性化ドメインであることを示している。

#### 【0017】

##### 【発明の効果】

本発明の遺伝子（配列番号2）及び遺伝子産物（配列番号1）は生殖系のみに発現しており、特に卵巣で強く発現するため、排卵障害やステロイドホルモン産生異常の原因ともなりうることから、この遺伝子の異常あるいは産生異常を調べることにより、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等の生殖系器官の異常に起因する疾患の原因究明と治療に利用できる。

またアミノ酸配列（配列番号1）中の転写活性化領域に作用する薬剤を開発すれば、それは上記疾患の治療薬となる。

#### 【0018】

##### 【実施例】

以下、実施例にて本発明を例証するが、本発明を限定することを意図するものではない。

##### 実施例1

まず、ラット顆粒膜細胞を培養した。未成熟のWistarラット（21日齢）を使用した。ごま油0.1ml中にジエチルスチルベストロール（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）2mgを加え、1日1回、4日間処置することにより卵巣顆粒膜細胞の増

殖を刺激した。常時、国立衛生研究所のガイドラインに従って動物を処置した。卵巣を切開し、26ゲージの針を用いて卵胞を穿刺することにより顆粒膜細胞を分離し、分離した顆粒細胞を集めた。細胞を洗浄し、室温、5分間500g×5の簡単な遠心により細胞を採取し、トリパンブルー染色により生存性を調べた。細胞生存率は90%以上であった。その後、顆粒膜細胞をコラーゲン処理したプレート上に抗生物質と0.1%BSAを添加したHam F-12:Dulbeccoの修正Eagle培地 (1:1, V:V) 中に入れ、炭酸ガス5%と空気95%を含む加湿混合ガス内で37℃下で培養した。

#### 【0019】

次に、酵母2種融合スクリーニングを行った。酵母2種融合システムにはCLONTech Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA) から購入したキットを用いた。全ての実験手順は、特記した以外は製造元の指示書に従って実施した。酵母2種融合システムのための親ベクターであるpGBKT7ベクターは酵母内でGAL4 DBD融合蛋白を発現する。誘導プラスミドであるpGBKT7-GIOT-1ベクターは以前記述した方法(非特許文献1)により作製した。TE/LiOAcを基本とした高効率形質転換法(Biotechniques 24: 596-600 (1998) 参照)を用いて、この誘導プラスミドによりAH109細胞を形質転換させた。酵母2種融合スクリーニングのためにラット顆粒膜細胞からプラスミドcDNAライブラリーを、既報(Biol Reprod 64: 1315-1319 (2001)参照)に従って、作製した。pGBKT7-GIOT-1を有する酵母をライブラリーにより形質転換し、約 $7 \times 10^6$ 個の最初の形質転換した細胞を得た。次いで全てのクローンをスクリーニングし、7種のHIS3<sup>+</sup>/ADE2<sup>+</sup>/MEL1<sup>+</sup>陽性クローンを得た。Big DyeターミネーターFSサイクル配列化キットと3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan)を用いてヌクレオチド配列解析を行い、次いでGenBank DNAデータベースを用いて同一性検索を行うことにより全てのクローンの特徴を調べた。データベースを用いた検索により、4種のクローンのヌクレオチド配列は既知の蛋白をコード化する遺伝子(非特許文献1)と高い類似性を有し、他の3種クローンは新規の蛋白をコード化することが判明した。この3種の新規クローンから、pACT2-GCX-1と名付けられ、HMG-boxモチーフを有する1219-bpを含むプラスミドを単離した。更に解析を行うために、758-bp EcoRI/BamHI断片(nt-160/597)をpBluescript II SK (+) ベクター(Stratagene, La Jolla, CA)のEcoR

I/BamHI部位へサブクローニングし、得られたプラスミドをpBS-GCX-1と命名した。

#### 【0020】

次に、 $\lambda$ -ファージcDNAライブラリーの作製と全配列GCX-1 cDNAのクローニングを行った。TRIzol試薬 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) を用いて、ヒツジFSH (National Hormone and Pituitary Distribution Program, Bethesda, MD) 30ng/mlを3時間処置して、顆粒膜細胞から全RNAを作製した。oligotex dT-30 super (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) を用いてpoly(A)<sup>+</sup>-RNAを単離した。oligo-dTをプライマーとし、cDNA合成システムとSuperscript II (Invitrogen) を用いて15  $\mu$ gのpoly(A)<sup>+</sup>-RNAからcDNAを合成した。EcoRI/NotIアダプターを二本鎖cDNAに結合させ、両端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した。そのcDNAを $\lambda$ ZAP Expressファージアーム (Stratagene) に結合させ、Gigapack III gold (Stratagene) を用いてin vitroで包括することにより、cDNAライブラリーを作製した。そのcDNAライブラリーは $1 \times 10^7$  個の独立したクローンを含んでいた。

GCX-1に対応する全配列cDNAを単離するために、ライブラリーをBcaBest DNA標識キット (宝バイオメディカルス) により標識されたpBS-GTX-1の758-bp  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP標識EcoRI/BamHI断片を用いてスクリーニングした。約60,000種のcDNAクローンから11種の陽性のクローンを単離した。

#### 【0021】

この蛋白をコード化する完全なcDNAクローンを単離するために、単離クローンをプローブとして用いることによりそのcDNAライブラリーを再びスクリーニングし、473個のアミノ酸の蛋白をコード化する遺伝子の完全なcDNAクローンを得た (配列番号2)。この塩基配列からアミノ酸配列 (配列番号1) を得た。

図1に示すように、この蛋白は蛋白中心部に1個のHMG-boxモチーフ (配列番号1のアミノ酸配列の205-272位) を有している。そのために、発明者らはそれをGCX-1 (granulosa cell HMG-box protein-1) と呼ぶ。その蛋白はHMG-boxのN末端に1個のNLS (nuclear localization signal) 様モチーフ (配列番号1のアミノ酸配列の180-199位) と夫々セリン高含有部位 (配列番号1のアミノ酸配列の124

-164位)、プロリン高含有部位(配列番号1のアミノ酸配列の348-431位)、リジン高含有部位(配列番号1のアミノ酸配列の180-199位)から成る3つのドメインも有している。これらの構造的特徴は転写調節因子に典型的なものである。

#### 【0022】

##### 実施例2

GCX-1の組織分存を調べるために、21日齢のラットの各種の組織についてRT-PCRを行い、ノーザンブロット解析を行った。

21日齢の雌ラットをPMSG(帝国臓器株式会社)30IU又はhCG(三共株式会社)50IUで感作し、卵巣を記述した時間に採取した。未成熟雌ラットの各種組織(視床下部、下垂体、小脳、副腎腺、腎臓、脾臓、腸管、肝臓、子宮及び卵巣)と未成熟雄ラットの睾丸から、TRIzol試薬を用いて全RNAを抽出した。ノーザンブロット解析のために、10 $\mu$ gの全RNAを1%変性アガロースゲル上で電気泳動により分離し、ナイロン膜(Biodyne, ICN Biomedicals, Inc., Glen Cove, NY)に移し、UV照射により交差結合させた。前融合と融合を行うために、ExpressHybハイブリダイゼーション液(CLONTECH)を用いた。既に記述したpBS-GCX-1の758-bp放射線標識EcoRI/BamHI断片又はラットUSF-2(上流刺激因子)の1.4-kbp  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP標識BamHI断片をプローブとして使用した。前融合、融合及び洗浄法に関する条件は、提供者から得たプロトコールに従って実施した。ブロットをFUJIX映像板(富士写真フィルム)に曝露した。融合信号をFUJIX BAS-2000画像解析装置を用いて検出した。RT-PCRを行うために、5 $\mu$ gの全RNAを逆転写し、反応混合液の一部(1/100)をPCR反応に使用した。プライマーとして5'-CCCAATGAGCCACAGAGCCA-3'(5'-プライマー: nt 589/609、配列番号3)と5'-GGAAAGCCTGCAGGTCCGAG-3'(3'-プライマー: nt 936/955、配列番号4)を用いた。反応条件として、FastStart Taq DNA Polymerase (Roche)を用いて20秒間94℃で変性、30秒間55℃でアニールし、45秒間72℃で伸展する操作を30回行った。1.5%アガロースゲル上でPCR産物10 $\mu$ lを電気泳動し、次いで臭化エチジウム(EtBr)染色により可視化した。その結果を図2に示す。

#### 【0023】

GCX-1遺伝子の発現は、視床下部(hypothalamus)、下垂体(pituitary)、睾丸(t

estis)、子宮(uterus)及び卵巣(ovary)などの、の限定された組織中において検出された。GCX-1の発現は卵巣中で最も高かったが、副腎腺(adrenal)と胎盤(データは示していない)中では発現が見られなかった。このことは、GCX-1は視床下部-下垂体-生殖腺軸上で作用していることを強く示唆している。

#### 【0024】

##### 実施例 3

in situ融合法により卵胞発育の各段階でのGCX-1の発現について調べた。

アンチセンスプローブ作製のために、EcoRIにより直線化されたpBS-GCX-1をin vitroでT3 RNAポリメラーゼ(Roche)と $\alpha$ -<sup>35</sup>S CTPにより転写した。T7RNAポリメラーゼ(Roche)と $\alpha$ -<sup>35</sup>S CTPを用いてBamHI分解pBS-GCX-1からセンスプローブを転写した。次に、ラット卵巣を鋳型にはめ込み、ドライアイス中で凍結した。12~14 $\mu$ mの厚さの切片をクリオスタットで作製し、in situ融合のためにAPSをコートしたスライドガラス上に包埋した。融合前に切片をプロテイナーゼKを処置し、アセチル化した。<sup>35</sup>S標識cRNAプローブとの融合は60℃で6時間行い、切片を高ストリンジェンシーで洗浄し、NTB3乳化剤(Eastman Kodak Co., Rochester, NY)を用いてオートラジオグラフ解析を行った。

#### 【0025】

その結果を図3に示す。Aは8日齢、Bは21日齢、Cは成熟(発情間期)のラットの卵巣を摘出し、GCX-1の<sup>35</sup>S標識アンチセンス鎖cRNAプローブと融合させたものを示す。Dは、21日齢ラットの卵巣の切片をセンス鎖cRNAプローブと融合させたものを示す。

図3のAに示すように、非常に早期の前胞状段階の卵胞において強い信号が検出され、その発現は顆粒膜細胞層に限定していた。同様レベルの発現は2又はそれ以上の顆粒膜細胞層を有する僅かに進行した段階の卵胞でも観察された。図3のBに示すように、大型前胞状と小型胞状段階の卵胞においてもその信号が検出されたが、更に進行した段階の大型胞状卵胞では非常に低レベルの発現が観察された。更に、図3のCに示すように、その信号は黄体中では僅かしか検出されなかった。これらの所見は、GCX-1遺伝子発現は早期の発育段階の卵胞中の未分化顆粒膜細胞に限定されていることを示している。

## 【0026】

実施例 4

GCX-1に対する抗体を作製して、細胞中の内因性GCX-1蛋白を確認した。

NH<sub>2</sub>-SLLHLGDHEAGYHSLC-CO<sub>2</sub>Hペプチド配列（配列番号1のアミノ酸配列の39-54位）を用い、IgG精製によりGCX-1特異的ウサギポリクローナル抗血清を作製した。顆粒膜細胞を培養液5ml中に5×10<sup>6</sup>生細胞を含む60mmシャーレ中で無ホルモン条件下で24時間培養し、細胞をスクレーパーを用いて集め、燐酸緩衝食塩液（PBS）10mlで洗浄した。得られた細胞を1mlのPBS中に懸濁し、エッペンドルフ管内へ移し、4℃下で1500×g、10分間の遠心により、固形化した。既報（Nucleic Acid Res 17: 6419（1989））に従って、顆粒膜細胞の細胞抽出物を作製した。細胞固型物を600μlの冷却緩衝液A（10mM HEPES, pH7.9；10mM KCl；1mM EDTA；0.5mM EGTA；1mM DTT；及び0.5mM PMSF）中で静かにピペット処理することにより再懸濁した。細胞を15分間氷の上で膨張させ、その後、Nonidet P-40 10%液 37.5μlを加え、10秒間強く攪拌した。得られたホモジネートを4℃下で5分間、17000×gで遠心した。上清を蛋白分析のための細胞質分画として用い、核固型物を40μlの氷冷緩衝液C（20mM HEPES, pH7.9；0.4M NaCl；1mM EDTA；1mM EGTA；1mM DTT；及び1mM PMSF）中に再懸濁し、試験管を振盪台上で4℃15分間強く振盪した。その混合液を4℃下で15分間17000×gで遠心し、得られた上清を核分画として蛋白分析に使用した。GFP-GCX-1融合蛋白を発現しているHepG2細胞から採取した核抽出物を同じプロトコールに従って作製した。細胞質と核抽出物（各100μg）を還元条件下で10%アクリルアミドゲル上でSDS-PAGEにより電気泳動を行った。蛋白をImmobilon-Pニトロセルロース膜（Millipore Co., Bedford, MA）の方へ電気泳動により移動させ、ミルク緩衝液（PBS-T[0.0001%のTween-20を含有するPBS]中に5%のスkimミルク添加）と、室温中で1時間、ミルク緩衝液中のIgG純化GCX-1抗体（0.019μg/ml）とインキュベートすることによりブロッキングを行った。膜をPBS-Tを用いて洗浄し、ECL-Plusキット（Amersham Biosciences Co., Piscataway, NJ）を用いて、製造元の提示書に従って免疫反応性のGCX-1蛋白を検出した。

## 【0027】



その結果を図4に示す。図中、AはGCX-1特異的抗血清の解析を示す。pEGFP-C1E1-移入 (lane 1) 又はpEGFP-GCX-1 (-61-473) 移入 (lane 2) HepG2細胞の核抽出物を抗GCX-1血清 (IgG精製を行った) によるウエスタンブロット解析に供した。1本のGFP-GCX-1融合蛋白に対する特異的バンドが示されている。Bは、ラット卵巣の顆粒膜細胞における内因性GCX-1蛋白の検出を示す。培養顆粒膜細胞から細胞質 (lane 1) と核 (lane 2) 抽出物を作製し、同じ抗血清を用いてウエスタンブロット解析を行った。1本のGCX-1特異的バンドが示されている。

図4のAに示すようにポリクローナル抗体は効果的にGFP-GCX-1蛋白 (lane 2) を認識した。免疫反応性のGCX-1はラットの顆粒膜細胞の核抽出物中 (図4のB、lane 2) でのみ検出されるが、細胞質分画中 (図4のB、lane 1) では検出されない。

【0028】

#### 実施例5

GCX-1は核内蛋白であり、転写因子に典型的なモチーフの1種であるHMG-boxを有していることから、GCX-1の転写活性について調べた。

GCX-1蛋白の標的遺伝子が未だ不明であることから、GCX-1の転写能を確認するためにGAL4を基本とする非相同性ルシフェラーゼレポーターシステムを用いた。pRL-CMV 1ngと5×GAL4-E1b/Lucホタルルシフェラーゼレポータープラスミド又はpGL3-基本レポータープラスミド100ngをHepG2細胞に同時移入した。図5に記述した量のpSG-GCX-1 (-61-473) を同様に細胞内へ移入した。各試料中に等量のDNAを含むようにGAL4 DBDのみを発現するpSG424をある試料中へ添加した。

その結果を図5に示す。GAL4 DBD-GCX-1融合蛋白の発現はレポータールシフェラーゼ活性を大きく増強させた。GCX-1プラスミド0.1ngを添加すると、約25倍のルシフェラーゼ活性の誘導を起し、1ngのプラスミドは約100倍の誘導を起した。一方、GAL4結合配列を有しないレポータープラスミドを5×GAL4-E1b/Lucの代わりに用いると、GCX-1プラスミドの同時移入によっても誘導は見られなかった。これらの所見はGCX-1は非常に強力な転写活性化因子であることを明確に示している。

【0029】

実施例 6

次いでGCX-1の相互活性化ドメインについて調べた。GAL4 DBD-GCX-1欠損変異を有する各種のプラスミド構成物を作製し、pRL-CMV 1ng、5×GAL4-E1b/Lucレポータープラスミド100ng及びpSG-GCX-1欠損各種変異体1ngをHepG2細胞に同時移入した。その結果を図6に示す。

図6に示すように、N末端から25-63個のアミノ酸残基間の部位はGCX-1の転写活性に必須であることが証明された。この部位は今までに報告されている典型的な転写活性化モチーフを含有していない。

【0030】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> 転写活性化因子

<130> PS03-1238

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 473

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Ser Asp Gly Asn Pro Glu Leu Leu Ser Thr Ser Gln Thr Tyr Asn

1 5 10 15

Ser Gln Gly Glu Ser Asn Glu Asp Tyr Glu Ile Pro Pro Ile Thr Pro

20 25 30

Pro Asn Leu Pro Glu Pro Ser Leu Leu His Leu Gly Asp His Glu Ala

35 40 45

Gly Tyr His Ser Leu Cys His Gly Leu Ala Pro Asn Gly Leu Leu Pro

50 55 60

Ala Tyr Ser Tyr Gln Ala Met Asp Leu Pro Ala Ile Met Val Ser Asn  
65                      70                      75                      80  
Met Leu Ala Gln Asp Gly His Leu Leu Ser Gly Gln Leu Pro Thr Ile  
                    85                      90                      95  
Gln Glu Met Val His Ser Glu Val Ala Ala Tyr Asp Ser Gly Arg Pro  
                    100                      105                      110  
Gly Pro Leu Leu Gly Arg Pro Ala Met Leu Ala Ser His Met Ser Ala  
                    115                      120                      125  
Leu Ser Gln Ser Gln Leu Ile Ser Gln Met Gly Leu Arg Ser Gly Ile  
                    130                      135                      140  
Ala His Ser Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Lys Ser Ala Thr Pro Ser  
145                      150                      155                      160  
Pro Ser Ser Ser Thr Gln Glu Glu Glu Ser Asp Ala His Phe Lys Ile  
                    165                      170                      175  
Ser Gly Glu Lys Arg Pro Ser Thr Asp Pro Gly Lys Lys Ala Lys Asn  
                    180                      185                      190  
Pro Lys Lys Lys Lys Lys Lys Asp Pro Asn Glu Pro Gln Lys Pro Val  
                    195                      200                      205  
Ser Ala Tyr Ala Leu Phe Phe Arg Asp Thr Gln Ala Ala Ile Lys Gly  
                    210                      215                      220  
Gln Asn Pro Ser Ala Thr Phe Gly Asp Val Ser Lys Ile Val Ala Ser  
225                      230                      235                      240  
Met Trp Asp Ser Leu Gly Glu Glu Gln Lys Gln Ala Tyr Lys Arg Lys  
                    245                      250                      255  
Thr Glu Ala Ala Lys Lys Glu Tyr Leu Lys Ala Leu Ala Ala Tyr Arg  
                    260                      265                      270  
Ala Ser Leu Val Ser Lys Ser Pro Pro Asp Gln Gly Glu Ala Lys Asn  
                    275                      280                      285  
Ala Gln Ala Asn Pro Pro Ala Lys Met Leu Pro Pro Lys Gln Pro Met

290 295 300  
Tyr Ala Met Pro Gly Leu Ala Ser Phe Leu Thr Pro Ser Asp Leu Gln  
305 310 315 320  
Ala Phe Arg Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Leu Ala Arg Thr Leu Gly  
325 330 335  
Ser Lys Ala Leu Leu Pro Gly Leu Ser Thr Ser Pro Pro Pro Pro Ser  
340 345 350  
Phe Pro Leu Ser Pro Ser Leu His Gln Gln Leu Pro Leu Pro Pro His  
355 360 365  
Ala Gln Gly Thr Leu Leu Ser Pro Pro Leu Ser Met Ser Pro Ala Pro  
370 375 380  
Gln Pro Pro Val Leu Pro Ala Pro Met Ala Leu Gln Val Gln Leu Ala  
385 390 395 400  
Met Ser Pro Ser Pro Pro Gly Pro Gln Asp Phe Pro His Ile Ser Asp  
405 410 415  
Phe Pro Ser Gly Ser Gly Ser Arg Ser Pro Gly Pro Ser Asn Pro Ser  
420 425 430  
Ser Ser Gly Asp Trp Asp Gly Ser Tyr Pro Ser Gly Glu Arg Gly Leu  
435 440 445  
Gly Thr Cys Arg Leu Cys Arg Ser Ser Pro Pro Pro Thr Thr Ser Pro  
450 455 460  
Lys Asn Leu Gln Glu Pro Ser Ala Arg  
465 470

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1419

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 2

atgagtgcgc gaaatccaga gctcctgtca accagccaga cctataacag ccagggcgag 60

agcaacgaag actatgagat ccctcctata acacctccca atctccctga gccatccctc 120  
ctgcacctgg gggaccacga agccgggttac cactcactgt gtcacggcct tgcgcccac 180  
ggtctgctcc ccgcctactc gtaccaggca atggatctcc cggccatcat ggtgtccaac 240  
atgctggccc aggatggcca cctgctgtca ggacagctgc ccacgatcca ggaaatggtc 300  
cactcggagg tagctgccta tgactcaggc cggccagggc ccctgctggg ccgccctgcg 360  
atgctggcca gccacatgag tgccctcagt caatcccagc tcatctccca gatgggcctc 420  
cggagtggca ttgccacag ctccccatca ccccaggga gcaagtcagc aaccccgctc 480  
ccatccagct ccacccaggga ggaggagtca gatgccatt tcaagatttc aggagagaag 540  
agacctcaa cagacccagg caaaaaggcc aaaaatccaa agaagaagaa gaagaaggat 600  
cccaatgagc cacagaagcc agtgtcggcc tacgtctctt tcttcagaga cactcaggct 660  
gccatcaagg ggcagaacct cagtgccacc tttggggatg tttccaaaat tgtggcctcc 720  
atgtgggaca gcctgggaga agagcagaaa caggcgtata agaggaagac cgaagctgcc 780  
aagaaggagt acctgaaagc cttggcggcc tacagagcta gcctcgtgtc caagagcccc 840  
ccggaccaag gcgaggccaa gaacgctcag gcaaaccac cagccaaaat gcttccacct 900  
aagcagccca tgtacgcat gcccggcctg gcttccttcc tgacgcctc cgacctgcag 960  
gctttccgca gcgcagcctc tcttgccagc ctgcagaaa cgctgggctc caaggccctg 1020  
ctgccaggcc tcagcacctc cccaccacca cctccttcc ctctcagccc ctcttgcac 1080  
cagcagctgc cactgccacc ccacgcgcag ggtacctcc tcagcccgc tctcagcatg 1140  
tccccagccc cgcagcctcc tgtcctgcct gccccatgg cactccaggt gcagctggcg 1200  
atgagcccct cgctccagg gccacaggac tttccacaca tctctgactt cccagtggc 1260  
tctggctccc gctcacctgg cccatccaac ccttcagca gcggggactg ggatgggagt 1320  
taccacagtg gggagcgcgg cctcggcacc tgcagactct gcagaagcag cccaccgccc 1380  
accaccagcc caaagaacct gcaggaacct tctgcccgc 1419

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 3

cccaatgagc cacagaagcc a

21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 4

ggaaagcctg caggtcggag

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

GCX-1の推定アミノ酸配列（配列番号 1）を示す図である。下線は推定上の核局在信号（NLS）部位を示し、太線は推定上のHMG-boxドメインを示す。

【図 2】

ラットにおけるGCX-1の遺伝子発現を示す図である。

【図 3】

ラット卵巣中のGCX-1のin situ融合化を示す図である。左図は明視野観察、右図は暗視野を示し、目盛り線は0.2mmを示す。

【図 4】

内因性GCX-1蛋白の同定を示す図である。

【図 5】

GCX-1は転写活性化因子であることを示す図である。各測定値は、4回の独立した移入実験における平均値とSDで示す。

【図 6】

GCX-1の相互活性化ドメインの決定を示す図である。各測定値は4回の独立した移入実験における平均値とそのSDで示している。

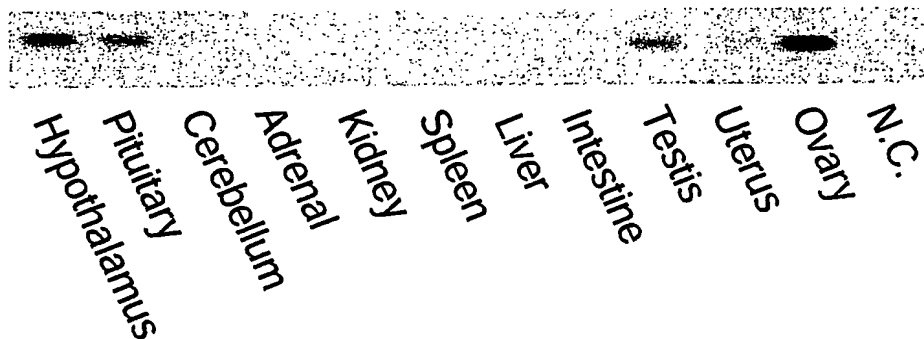
【書類名】 図面

【図 1】

1 MSDGNPELLSTSQTYSQGESNEDYEIPPITPPNLPEPSLLHLGDHEAGY 50  
51 HSLCHGLAPNGLLPAYSQAMDLP AIMVSNMLAQDGHLLSGQLPTIQEMV 100  
101 HSEVAAYDSGRPGPLLGRPAMLASHMSALSQSQLISQMGLRSGIAHSSPS 150  
151 PPGSKSATPSPSSSTQEEESDAHFKISGEKRPSTDPGKKAKNPKKKKKKD 200  
201 PNEPQKPVSAAYALFFRDTQAAIKGQNPSATFGDVSKIIVASMWDSLGEEOK 250  
251 QAYKRKTEAAKKEYLKALAAAYRASLVSKSPPDQGEAKNAQANPPAKMLPP 300  
301 KQPMYAMPGLASFLTPSDLQAFRSAASPASLARTLGSKALLPGLSTSPPP 350  
351 PSFPLSPSLHQQLPLPPHAQGTLLSPPLSMSPAPQPPVLPAPMALQVQLA 400  
401 MSPSPPGPQDFPHISDFPSGSGSRSPGPSNPSSSGDWDGSYPSGERGLGT 450  
451 CRLCRSSPPPTTSPKNLQEPSAR 473

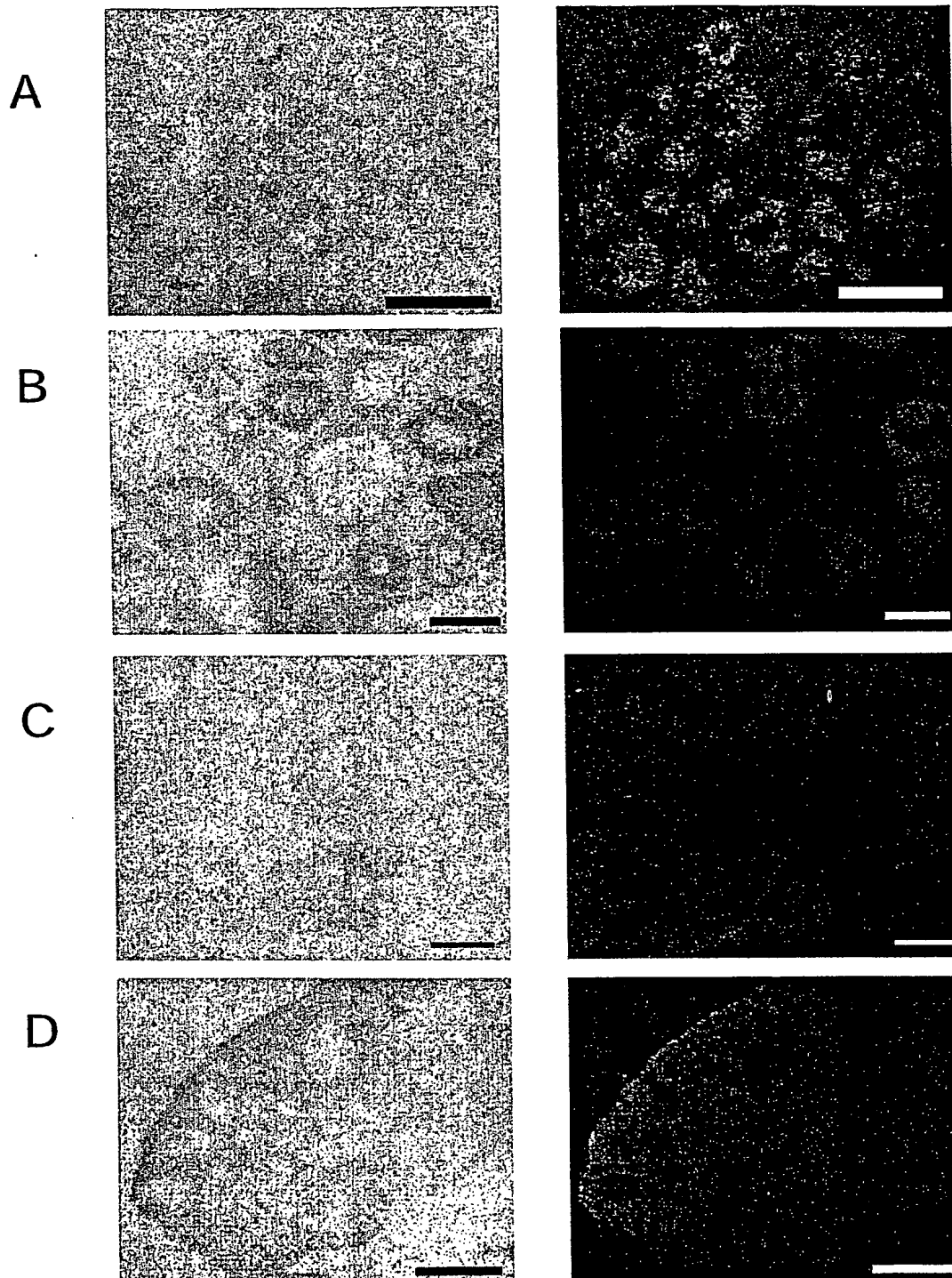
【図 2】

GCX-1



BEST AVAILABLE COPY

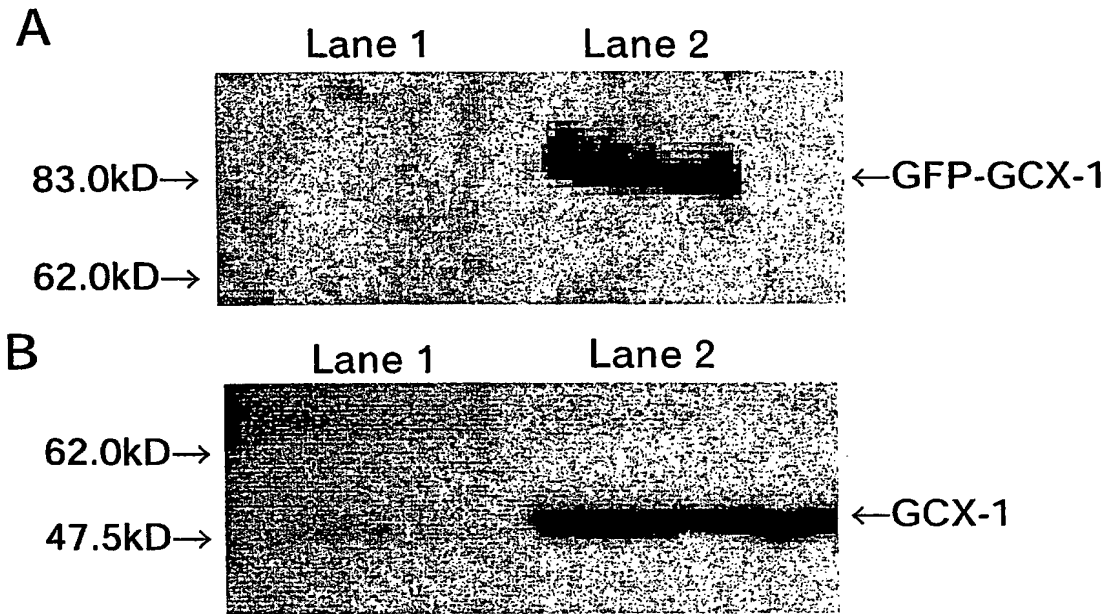
【図3】



BEST AVAILABLE COPY

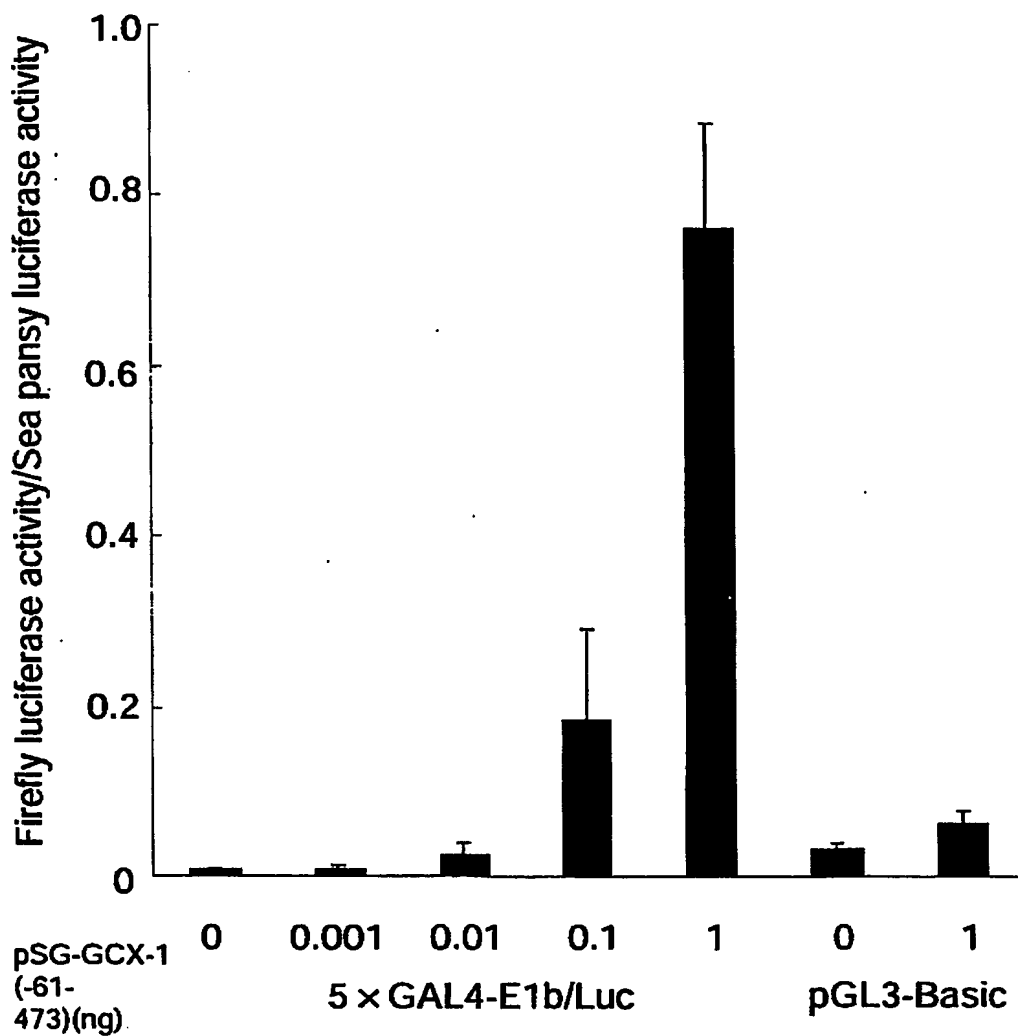


【図4】



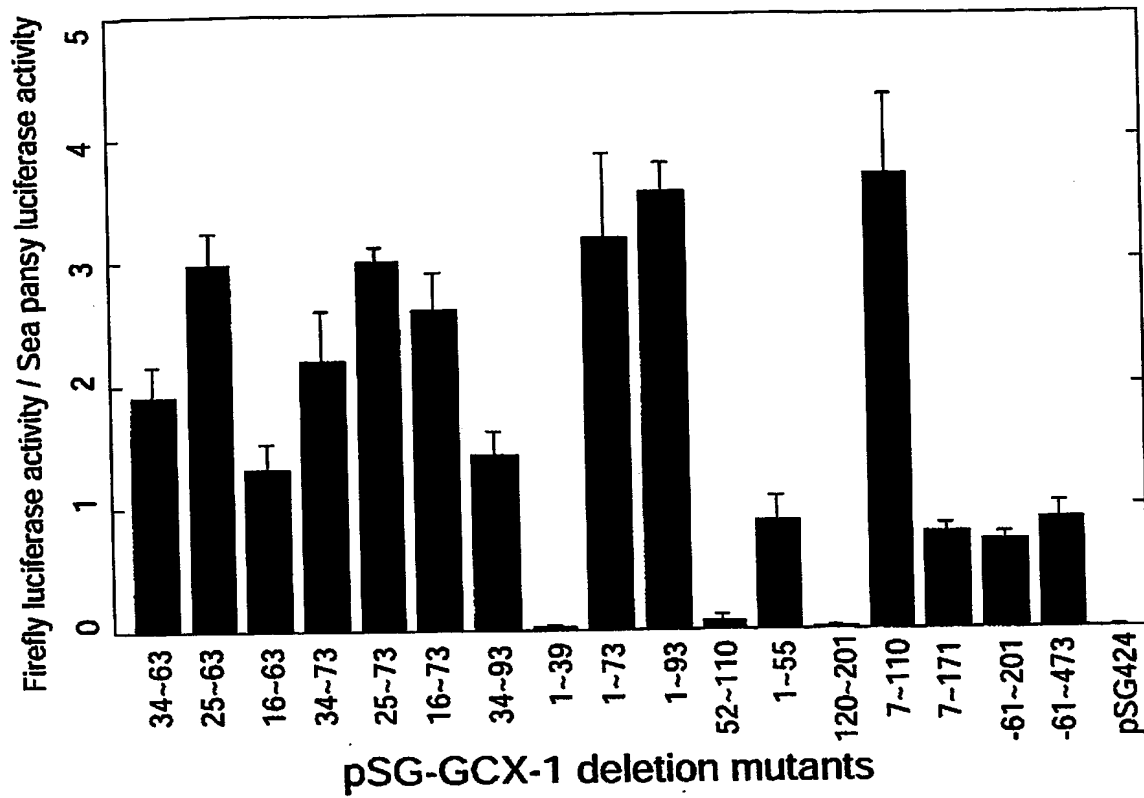
BEST AVAILABLE COPY

【図5】



BEST AVAILABLE COPY

【図6】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生殖組織に特異的であり、視床下部－下垂体－生殖腺軸中で重要な役割を有していると考えられる新規な転写因子GCX-1を提供する。

【解決手段】 卵巣中に卓越して発現している新規遺伝子GCX-1（配列番号2）をラットの卵巣顆粒細胞のcDNAライブラリーから単離した。この遺伝子及び遺伝子産物（配列番号1）の異常あるいは産生異常を調べたり、この転写活性化領域に作用する薬剤を開発すれば、不妊症、多のう胞性卵胞症候群、子宮内膜症、思春期早発症、骨粗しょう症等の生殖系器官の異常に起因する疾患の原因究明と治療が可能である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-018343
受付番号	50300129847
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成15年 1月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 1月28日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-018343

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団